

MALI IGRAČI, VELIKA ULOGA

POVODOM 70. GODIŠNJICE LABORATORIJA ZA MIKROBIOLOGIJU INSTITUTA ZA OCEANOGRFIJU I RIBARSTVO U SPLITU

prof. dr. sc. Mladen Šolić, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju

UVODNA RIJEČ

*Mikrobi su svugdje...**Mikrobi su svemoćni...**Mikrobi će imati posljednju riječ...*

(Louis Pasteur)

U Laboratoriju za mikrobiologiju Instituta za oceanografiju i ribarstvo zaposlio sam se 1983. godine, nepunu godinu nakon što sam diplomirao na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu i tu sam i danas. Pričajući o 70 godina Laboratorija za mikrobiologiju (1947.-2017.), za prvu polovicu toga razdoblja oslonio sam se isključivo na postojeće dokumente i usmena svjedočanstva kolega koji su bili aktivni u tom razdoblju, a tijekom druge polovice toga razdoblja i sam sam bio svjedok događanja. Ovaj je članak napisan kao prilog obilježavanju ove obljetnice, te da ostane kao dokument za buduće naraštaje znanstvenika. Istovremeno, članak je i posveta prof. dr. sc. Vlaha Cviiću, utemeljitelju laboratorija, čiji znanstveni doprinos morskoj mikrobiologiji zaslužuje pažnju. Pripremajući materijale za kratku biografiju Vlahe Cviića bio sam nemalo iznenađen vidjevši da nije uvršten u Hrvatsku enciklopediju (mrežno izdanje iz 2014.). Članak je upravo zbog toga i podijeljen u dvije cjeline: prva je posvećena Vlaha Cviiću i razdoblju njegovog djelovanja (1947.-1963.), dok je druga posvećena razvoju laboratorija i njegovim aktivnostima tijekom zadnjih pet dekada.

1. VLAHO CVIIĆ — ZAČETNIK JADRANSKE MIKROBIOLOGIJE

Vlaho Cviić rođen je Virovitici 9. rujna 1909. Osnovnu i srednju školu završio je u Slavonskom Brodu. Studij prirodnih znanosti završio je na Filozofskom fakultetu u Zagrebu. Prije II. svjetskog rata radio je na gimnazijama u

Kumanovu, Subotici, Novoj Gradiški, Slavonskom Brodu i Splitu. Od 1947. dolazi kao znanstveni suradnik u Institut za oceanografiju i ribarstvo u Splitu gdje osniva Laboratorij za mikrobiologiju, gdje ostaje do prerane smrti 1. lipnja 1963. Istovremeno je u razdoblju od 1947. do 1949. bio ravnatelj Klasične gimnazije u Splitu. U razdoblju od 1956. do 1960. obnašao je funkciju direktora Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. Godine 1950. odlazi na specijalizaciju na Scripps Institution u La Joli (USA) kod čuvenog oca moderne mikrobiologije mora – morskog mikrobiologa, prof. Claude Ephraima ZoBella. Po povratku u Institut u Splitu pokreće vrlo široki spektar istraživanja mikrobiologije mora i dovodi Laboratorij za mikrobiologiju u rang sličnih laboratorija na Mediteranu. Doktorsku tezu pod naslovom *Rasprostranjenost bakterija u vodama srednjeg Jadrana i utjecaj nekih ekoloških faktora* obranio je 1953. Time ujedno postaje i začetnik morske mikrobiologije na Jadranu, kojom se, kao novom oceanografskom disciplinom, proširuje naša znanost o moru.



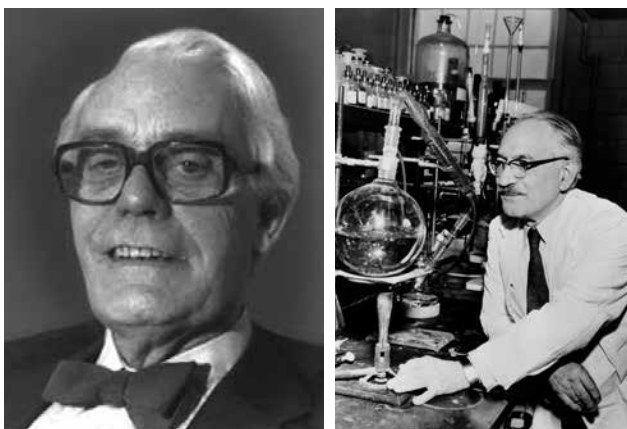
Slika 1: a) Vlaho Cviić; b) Claude E. ZoBell

Koliko u tom razdoblju jadranska mikrobiologija na čelu s Cvićem stoji uz bok svjetske morske mikrobiologije najbolje ilustrira sljedeća kronologija: (1) 1946. ZoBell objavljuje knjigu *Marine microbiology* koja se do danas smatra početkom morske mikrobiologije; (2) 1947. Cvić osniva Laboratorij za mikrobiologiju u Institutu za oceanografiju i ribarstvo; (3) 1950. Cvić odlazi na studijski boravak u SAD gdje radi sa ZoBellom; (4) po povratku iz SAD-a pokreće nevjerojatno široki spektar mikrobioloških istraživanja na Jadranu, te (5) od 1953. započinje kontinuirano objavljivanje znanstvenih radova koje traje do njegove smrti.

Jedan od važnijih znanstvenika toga vremena s kojim je Cvić uspostavio čvrstu znanstvenu suradnju bio je profesor Einer Steemann Nielsen iz Kopenhaga, priznati biokemičar i specijalist za proizvodnju fitoplanktona, koji je razvio metodu mjerenja primarne proizvodnje u vodenim okolišima putem ugradnje radioaktivnog ugljika (^{14}C). Steemann Nielsen je na poziv Cvića posjetio Institut za oceanografiju i ribarstvo 1958. godine i tom je prilikom demonstrirao svoju metodu. Cvić ubrzo uvodi ovu metodu u svoja istraživanja te 1963. godine publicira prve rezultate mjerenja organske proizvodnje u Jadranu metodom C^{14} .

Tablica 1: Kratki osvrt na najznačajnije znanstvene publikacije Vlahe Cvića.

Godina publiciranja i naslov rada	Kratki opis rezultata istraživanja
1953. The Bactericidal and bacteriostatical action of antibiotics on marine bacteria	Ekperimentalno istraživanje bakteriostatičkog i baktericidnog djelovanja penicilina i streptomicina na 41 soj morskih bakterija u prirodnoj morskoj vodi. Utvrđen je udio bakterija koje su osjetljive na ova dva antibiotika, te sinergijsko djelovanje ova dva antibiotika koja su u kombinaciji bila 20 puta efikasniji u odnosu na njihova pojedinačna djelovanja. Također su utvrđene i najniže koncentracije ovih antibiotika koje imaju totalno baktericidno djelovanje na ispitivane morske bakterije.
1953. Attachement of bacteria to slides submerged in sea water	U radu je istraživana brzina pričvršćivanja bakterija i drugih mikroorganizama na stakalca uronjena u more, što je od velike važnosti za procjenu brzine obraštaja različitih površina u moru. Bakterije su prve koje se pričvršćuju za površine i stvaraju uvjete za prihvata drugih mikroorganizama, među kojima su najbrojnije bile alge kremenjašice (dijatomeje). Pričvršćivanje je bilo brže u blizini obale nego na otvorenom moru. Tema obraštaja je i danas iznimno znanstveno zanimljiva.
1955. Red water in the lake „Malo jezero“ (Island of Mljet)	Istraživana je pojava vode ružičasto-crvene boje u Malom jezeru na otoku Mljetu, koja je uočena na 20 m dubine u svibnju, lipnju i kolovozu 1953. godine. Ustanovljeno je da su ovu pojavu izazvala dva soja bakterija <i>Rhodospseudomonas</i> sp, te da je pigment karetoidne prirode. Laboratorijska istraživanja su pokazala da ovi sojevi bakterija za svoj optimalni rast trebaju dosta organske tvari, mliječne kiseline i kalcijevog karbonata. U sloju mora u kojem je utvrđen ovaj fenomen utvrđene su visoke koncentracije fosfata i željeza.
1956. Activity of bacteria in the liberation of phosphate from the sea sediments in bottom water	U radu je utjecaj fosfata, kisika i koncentracije vodikovih iona (pH) na kolebanje broja heterotrofnih bakterija istraživano u kontroliranim laboratorijskim eksperimentima. Količina kemijski otopljenih fosfata iz mulja bila je proporcionalna količini mulja i obrnuto proporcionalna s količinom vode. Iz prirodnog morskog mulja u vodu su se izlučivale veće količine fosfata u anaerobnim uvjetima nego aerobnim. Jednako je tako suspenzija heterotrofnih bakterija oslobađala veće količine fosfata iz mulja u anaerobnim uvjetima.
1956. Multiplication of heterotrophic sea bacteria in various H-ion concentrations	Međusobna ovisnost rasta bakterija i koncentracije vodikovih iona (pH vrijednost) ispitivana je u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Rezultati su pokazali da morske heterotrofne bakterije povećavaju koncentraciju vodikovih iona u morskoj vodi, odnosno pomiču pH od alkalne prema kiselj reakciji. Taj je proces bio intenzivniji u bogatijim bakterijskim kulturama. Razmnožavanje heterotrofnih bakterija je u početku eksperimenata bilo intenzivnije u kiselijim sredinama (početni pH 6.81 i 6.97), nego u alkalnim uvjetima (početni pH 7.32 i 7.72).
1960. Contribution a la connaissance du role des bactéries dans l'alimentation des larves de langouste (<i>Palinurus vulgaris</i> Latr.)	Uloga bakterija u prehrani ličinki jastoga istraživana je u laboratorijskim uvjetima. Eksperimenti su pokazali da ličinke jastoga konzumiraju velike količine bakterija. U prosjeku je jedna ličinka jastoga konzumirala 0.26 mg bakterija tijekom razdoblja od 24 sata.
1963. Rasprostranjenost bakterija i bakterijske biomase u južnom Jadranu	U radu je prikazana raspodjela brojnosti heterotrofnih bakterija, čiji su maksimumi zabilježeni u sloju od 0-100 m dubine. Utvrđeni su jasni ljetni i zimski maksimumi, te proljetni i jesenski minimumi. Brojnosti su u južnom Jadranu bile značajno manje u usporedbi sa srednjim Jadranom. Rasprostranjenost bakterijske biomase pokazivala je nekoliko karakterističnih minimuma (sloj 0-100 m, sloj 300-400 m, te pri dnu), koji su bili najizraženiji u lipnju. Maksimumi bakterija poklapali su se s dubinom termokline.
1963. Premières mensurations de la production organique fondamentale en Adriatique	Iznoseni su podatci o prvom mjerenju organske proizvodnje u Jadranu metodom C^{14} . Izmjerene vrijednosti kretale su se od 0.4 mg C m^{-3} u otvorenom moru do 5.03 mg C m^{-3} u Kaštelanskom zaljevu.
1964. Primary organic production, distribution, and reproduction of bacteria in the middle Adriatic euphotic zone	Ovaj rad donosi rezultate vrlo opsežnih mjerenja primarne proizvodnje metodom C^{14} , te rasprostranjenosti i razmnožavanja bakterija u području srednjeg i sjevernog Jadrana. Općenito se pokazalo da je primarna proizvodnja u priobalnim vodama ili vodama pod izravnim utjecajem kopna ili slatke vode bila veća u odnosu na otvorene vode Jadrana. Broj bakterija bio je najveći u srednjem sloju eufotičke zone. Određeno je da prirast bakterijske biomase na sat po jedinici volumena morske vode iznosi od 0.70 do 1.53 mg na 1 m^3 bakterija.
1964. Prilog poznavanju rasprostranjenosti bakterijske biomase u srednjem Jadranu	Prva istraživanja bakterijske biomase u srednjem Jadranu pokazala su veliku vertikalnu i horizontalnu kolebljivost ovog parametra. Veće biomase utvrđene su u priobalnom području u odnosu na otvoreno more, kao i u eufotičkom sloju mora.



Slika 2: Znanstvenici s kojima je Vlaho Cvičić surađivao:
a) Einer Steemann Nielsen; b) i nobelovac Selman Abraham Waksman.

Pregled znanstvenih publikacija Vlaho Cvičića zapanjuje širinom interesa i problema koje je pokretao. Gotovo da svaki njegov rad otvara jedno novo područje morske mikrobiologije, a mnoga istraživanja koja je pokrenuo i danas su znanstveno zanimljiva i važna. Na žalost, znanstveni život Cvičića bio je kratak. Rezultate svojih istraživanja započinje intenzivno publicirati od 1953. godine, a umire već 1963., u 54. godini života.

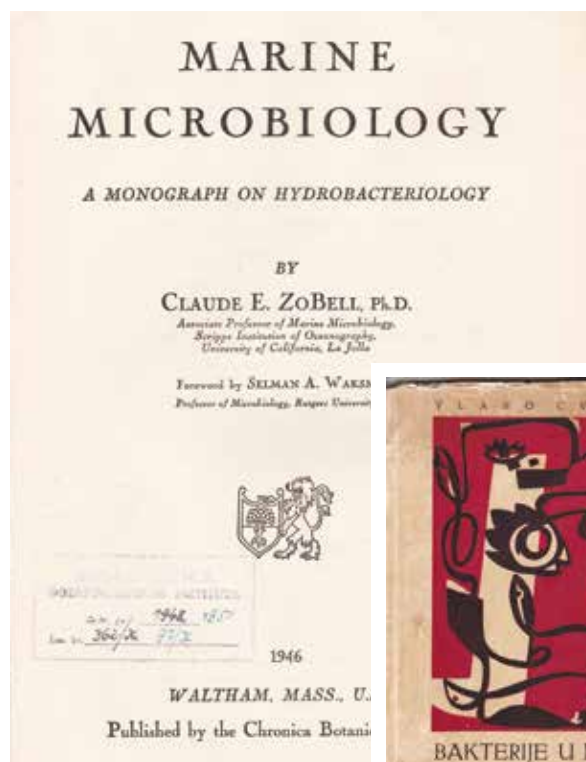
Osobito su zapaženi njegovi radovi o rasprostranjenosti bakterija u moru koju dovodi u vezu s ekološkim čimbenicima u moru, metodici rada u mikrobiologiji mora, regeneraciji fosfata u moru kroz bakterijsku razgradnju, što povezuje s produktivnošću Jadranskog mora i gospodarskim pitanjima vezanim za racionalno iskorištavanje morskih resursa. Za potrebe istraživanja regeneracije fosfata iz morskih sedimenata konstruirao je posebne geološke sonde za vertikalna sondiranja morskih muljeva i uzorkovanje u neposrednom kontaktnom sloju pridnene vode i sedimentološkog pokrova morskog dna. Kratki kronološki osvrt na najvažnije Cvičićeve znanstvene radove prikazan je u tablici 1.



Slika 3: a) Cvičićev rad iz 1963. u kojem su objavljena prva mjerenja primarne proizvodnje u Jadranu metodom C^{14} te b) bakteriološki crpaci kojeg je Cvičić koristio.

Znanstvena aktivnost donosi veliki ugled Cvičiću u znanstvenoj zajednici u svijetu. Izabran je za člana *Mikrobiološkog društva SAD-a* i *Internacionalne komisije za istraživanje Mediterana*. Imao je prisne kontakte s vodećim mikrobiolozima svoga vremena. Uz već spomenute ZoBella i Steemanna Nilsena, vrijedno je spomenuti njegove dobre odnose s **Selmanom Abrahamom Waksmanom**, pronalazačem streptomicina koji je efikasno liječio tuberkulozu, za što je dobio Nobelovu nagradu 1952. godine. Waksman je na poziv Cvičića posjetio Institut za oceanografiju i ribarstvo 1959. godine i tom je prilikom održao zapaženo predavanje o svojim istraživanjima.

Cvičićev doprinos razvitku i popularizaciji prirodnih znanosti u Splitu je nemjerljiv. Osniva podružnicu Prirodoslovnog društva u Splitu čiji je dugogodišnji predsjednik. Posebnu pažnju posvećuje radu organizacije Mladih biologa u srednjim i osnovnim školama u Splitu, pružajući im veliku stručnu, pedagošku, materijalnu i moralnu pomoć. Član je redakcije Prirodoslovne biblioteke pododbora Matice hrvatske u Splitu, u čijem izdanju izlazi njegova popularno-znanstvena knjiga *Bakterije u moru* (1963.). Vrlo aktivno objavljuje popularne članke u časopisima *Priroda*, *Morsko ribarstvo*, *Pomorstvo*, *Hidrografski godišnjak*, kao i različitim dnevnim novinama. U tim godinama gotovo sve što je u vezi s akcijama Hrvatskog prirodoslovnog društva na području Splita i okolice vezano je uz njegovo ime. Osnovao je ornitološku grupu s ciljem zaštite ptica te organizirao nezaboravnu astronomsku izložbu u Splitu.



Slika 4: a) ZoBellova knjiga *Marine Microbiology* (1946.) koja se smatra početkom morske mikrobiologije; b) Cvičićeva knjiga *Bakterije u moru* (1963.).

Njegova znanstveno-popularna knjiga *Bakterije u moru* (1963.) začetak je morske mikrobiološke znanosti na ovim prostorima. Knjiga daje pregled znanstvenih dostignuća u ovoj oblasti u svijetu, ali iznosi i rezultate Cvićevih istraživanja u Jadranu. Pisana je lako razumljivim i jednostavnim jezikom. Sveobuhvatnost iznesene problematike u knjizi postaje očigledna uvidom u njen sadržaj koji obuhvaća sljedeća poglavlja: 1. Uvod; 2. Bakterije u talozima morskog dna; 3. Bakterije u moru kao potrošači i razarači; 4. Bakterije u moru kao štetiočine; 5. Ispitivanje bakterija mora.

Prof. Petar Matković u *Bilješki o piscu* u ovoj knjizi koja iz tiska izlazi posthumno 1963. godine, kratko nakon prerane smrti Vlahe Cvića piše: „Ostao je uvijek tih, skroman, duboko refleksivan, oličenje poštenja i čestitosti, poslovično ustrajan u svim svojim djelatnostima. Upravo je strastveno volio rad i njemu se podavao. On mu je davao veoma sadržajni smisao života i zadovoljstvo stvarao.”

2. LABORATORIJ ZA MIKROBIOLOGIJU OD 1970-IH DO DANAS

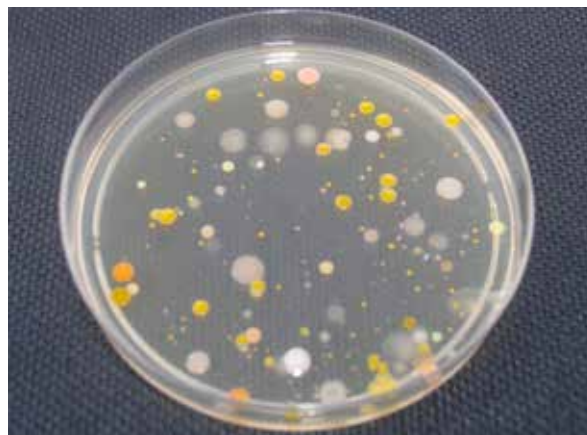
Glavna znanstvena preokupacija laboratorija od njegovog osnutka bila je morska mikrobna ekologija. U vrijeme Cvića to je bila isključivo bakteriologija, dok se u kasnijim razdobljima znanstveni interes proširio i na druge skupine mikroorganizama unutar pikoplanktonske i nanoplanktonske veličinske frakcije, a krajem 1970-ih se uvodi i problematika sanitarne mikrobiologije.

Morska mikrobiologija je relativno mlada disciplina koja se ubrzano razvijala tijekom zadnjih 30-ak godina. Metode i tehnike istraživanja ubrzano su se razvijale. Pratiti svjetske znanstvene trendove bio je veliki izazov, jer su kvalitativni skokovi uvijek bili vezani za razvitak novih skupih instrumenata.

2.1. Razdoblje hranjivih podloga

Nakon Cvića, nastavljaju se započeta istraživanja, ponajprije kroz sustavna istraživanja, smjesečnom dinamikom uzorkovanja, na profilu srednjeg Jadrana od Kaštelanskog zaljeva prema otvorenom moru. Međutim, brojnost bakterija se još uvijek određuje nasađivanjem na hranjive medije i brojanjem izraslih kolonija, te povremeno putem svjetlosnog i fazno-kontrastnog mikroskopa. Pa ipak, unatoč činjenici da je i na neselektivnim hranjivim podlogama izrastao vrlo mali udio od stvarnog ukupnog broja bakterija u moru, postojanje dugogodišnjih nizova podataka omogućavali su kvalitetnu analizu dugoročnih fluktuacija i njihovo povezivanje s nizom biotičkih, abiotičkih i antropogenih čimbenika, što su prestižni časopisi u to vrijeme rado objavljivali (Krstulović i Šolić, 1990.; Šolić i Krstulović, 1991.; Baranović et al., 1993.; Šolić et al., 1997.; Šolić, 2000.).

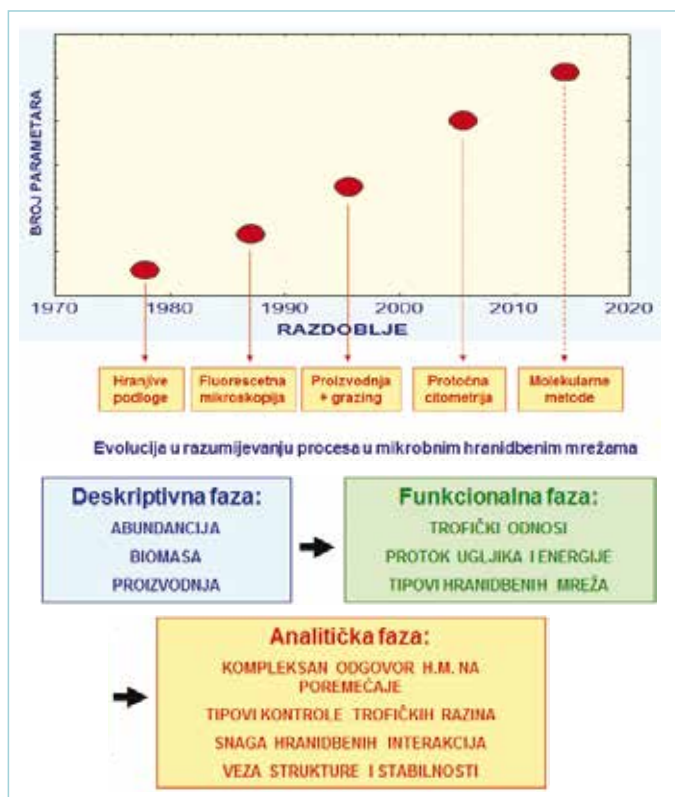
Pored toga, eksperimentiranjem sa sastavom hranjivih podloga, one su se mogle pripremiti više ili manje selektivnim, što je omogućavalo praćenje pojedinih fizioloških skupina bakterija (Šolić, 1988.; Krstulović i Šolić, 1988.; Šolić i Krstulović, 1992.).



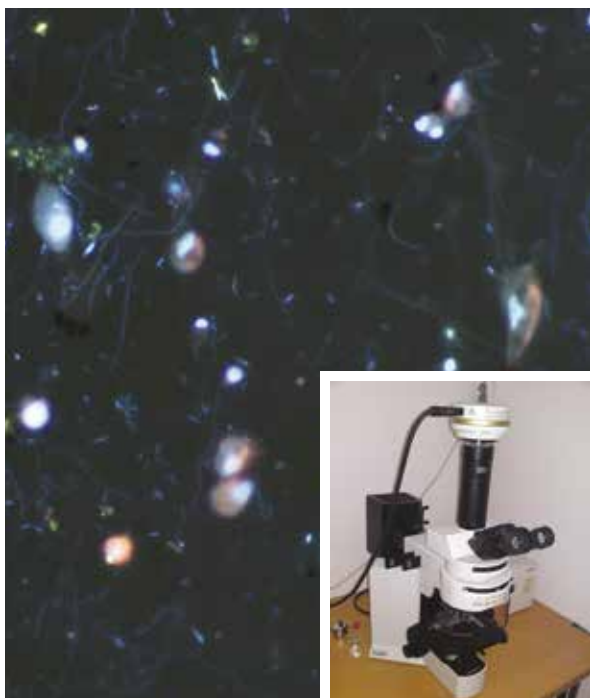
Slika 6: Kolonije heterotrofne bakterije na neselektivnoj hranjivoj podlozi.

2.2. Razdoblje epifluorescentne mikroskopije

Razvitak epifluorescentne mikroskopije bio je veliki korak naprijed u morskoj mikrobiologiji. Ovaj mikroskop omogućavao je daleko preciznije određivanje brojnosti bakterija nego što je to bio slučaj sa svjetlosnim mikroskopima. Nadogradnje s digitalnim kamerama i računalnim programima još su unaprijedile njihove mogućnosti, omogućile su precizna mjerenja dimenzija stanica, što je bilo od velike važnosti za izračunavanje biomase bakterija. Godine 1979. Nada Krstulović odlazi na studijski boravak u Marine Biology Institute (Aberdeen, Škotska), gdje se upoznaje s metodom epifluorescentne mikroskopije.



Slika 5: Kronološki pregled aktivnosti Laboratorija za mikrobiologiju od 1970-ih do danas prikazan kroz perspektivu novih metoda i tehnika istraživanja te napredak u razumijevanju procesa u mikrobim hranidbenim mrežama.



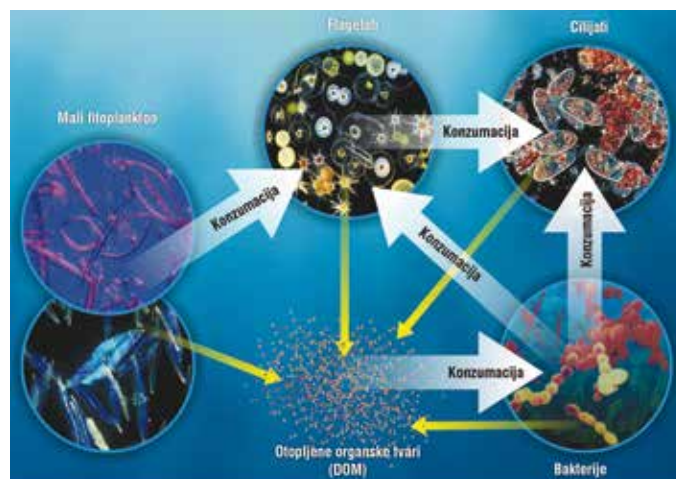
Slika 7: a) Epifluorescentni mikroskop, b) snimak mikroskopskog preparata na kojem se vide autotrofni i heterotrofni nanoflagelati.

Po povratku se nabavlja epifluorescentni mikroskop čime naš laboratorij hvata metodološki korak s naprednim laboratorijima u svijetu. Tijekom 1980-ih i 1990-ih nabavljaju se sve bolji mikroskopi, ali epifluorescentna mikroskopija ostaje glavna metodološka odrednica istraživanja morskih bakterija (Fuks et al., 1991.; Marasović et al., 1991.; Krstulović et al. 1991.; Šolić i Krstulović, 1991.). Dolaskom Stefanije Šestanović u laboratorij, 1995. godine, istraživanja heterotrofnih bakterija se s vodenog stupca proširuju i na sediment (Šestanović et al., 2005., 2009.).

2.3. Razdoblje „mikrobnog kruga“

Tijekom 1980-ih morska mikrobiologija u svijetu doživljava nevjerojatan razvoj. Znanstvenici postaju svjesni da je značaj bakterija i drugih mikroorganizama za procese u moru daleko veći nego što se ranije mislilo. Novi radovi iz tog vremena sugeriraju da mikroba zajednica broji nekoliko milijardi organizama u litri mora, da je njihova ukupna biomasa 10 puta veća od biomase svih drugih organizama u moru, da predstavljaju 95 % ukupne biološke površine u moru te da su odgovorni za 50 % primarne proizvodnje u moru.

Pored toga, u svom sada već „legendarnom“ radu Azam et al. (1983.) uvode pojam „mikrobnog kruga“ (*microbial loop*) kao posebnog puta u protoku ugljika i energije koji ide od otopljene organske tvari koju konzumiraju bakterije, te se preko heterotrofnih nanoflagelata (HNF) i ciliata spaja s klasičnim (herbivornim) lancem prehrane. Tijekom druge polovice 1980-ih i 1990-ih ova problematika postaje jedna od najvažnijih tema morskih mikrobiologa, a taj interes traje i do danas.

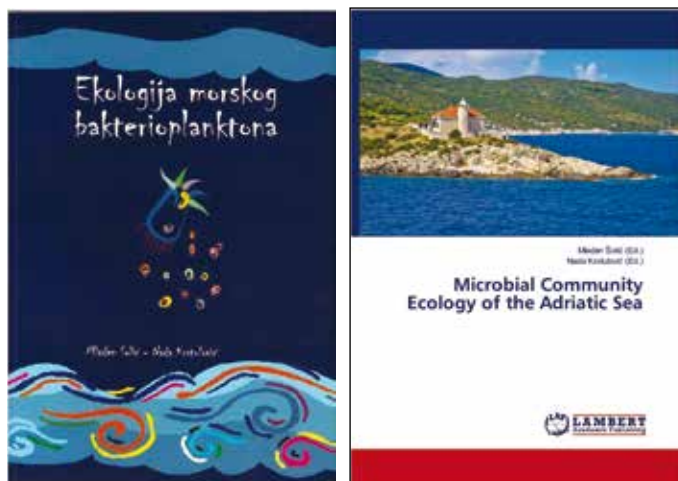


Slika 8: Shematski prikaz mikrobnog kruga (preuzeto iz Krstulović i Šolić, 2006.).

Mladen Šolić se u to vrijeme priprema za definiranje teme svoje doktorske disertacije, te ova recentna saznanja nedvosmisleno ukazuju na pravac kojim treba krenuti. Bavljenje ovom problematikom zahtijevalo je usvajanje novih saznanja o (1) mjerenju bakterijske proizvodnje; (2) mjerenju „grazinga“ bakterija od strane HNF, te (3) određivanju brojnosti HNF (što je bio najmanji problem, jer smo epifluorescentni mikroskop imali). Mladen Šolić uspijeva dogovoriti studijski boravak na Institute für Meereskunde, Kiel u Njemačkoj, gdje odlazi 1991. U to vrijeme u tom Institutu djeluje 7-8 vodećih svjetskih znanstvenika za problematiku morske mikrobiologije (poznati kao *Kielska grupa*). Po povratku iz Kiela laboratorij uspijeva nabaviti instrument za mjerenje bakterijske proizvodnje metodom ugradnje radioaktivnih obilježivača, te se pokreću prva istraživanja bakterijske proizvodnje i uloge bakterijskih predatora (osobito HNF) u protoku ugljika i energije duž planktonskih hranidbenih mreža („mikrobni krug“ i „mikrobna hranidbena mreža“) u našem dijelu Jadrana (Šolić i Krstulović, 1994., 1995.; Krstulović et al., 1995.; Šolić et al., 2001.). Tijekom 1990-ih i 2000-ih ovo je bio glavni pravac istraživanja, organiziraju se *in situ* „grazing“ eksperimenti, proučava se struktura i funkcija mikrobnih hranidbenih mreža i njenog kompleksnog odgovora na promjene uvjeta u okolišu (Krstulović et al., 1997.; Šolić et al., 1998., 2008., 2009.; Šestanović et al., 2004.).



Slika 9: a) Scintilacijski analizator za mjerenje bakterijske proizvodnje metodom ugradnje radioaktivnih obilježivača. Difuzijska komorica koja je dizajnirana u našem laboratoriju koja ima relativno veliki omjer između difuzijske površine i volumena komorice i vrlo je uspješno korištena za *in situ* eksperimente „grazinga“ bakterija od strane predatora.



Slika 10: Knjige a) *Ekologija morskog bakterioplanktona* (Šolić i Krstulović, 2000.) u kojoj je dan pregled novih saznanja iz područja morske mikrobne ekologije koja se tijekom 1980-ih i 1990-ih ubrzano razvijala, kao i pregled rezultata vlastitih istraživanja u Jadranu; b) *Microbial Community Ecology of the Adriatic Sea* (Šolić et al., 2016.) u kojoj su izneseni rezultati istraživanja Laboratorija za mikrobiologiju tijekom zadnjih 15-ak godina (knjiga je posvećena Vladi Cviiću).

Pregled svih tih ubrzano nagomilanih novih saznanja u morskoj mikrobiologiji na svjetskoj razini, protkanih rezultatima vlastitih istraživanja u Jadranu sintetiziraju se u knjizi *Ekologija morskog bakterioplanktona*, autora Mladena Šolića i Nade Krstulović, publiciranoj 2000. godine.

2.4. Razdoblje protočne citometrije

Izučavanja procesa u mikrobnoj hranidbenoj mreži pobudila su našu želju da pored bakterija i njihovih nanoflagelatnih predatora istraživanja proširimo i na druge skupine mikroorganizama, osobito cijanobakterija i autotrofnih piko-eukariota, kako bi naš uvid u procese u mikrobnoj hranidbenoj mreži bio cjelovit. Korištenje epifluorescentne mikroskopije za tu svrhu imalo je brojna ograničenja, ali tada se pojavljuje tehnika koja nam je upravo trebala – *protočna citometrija*. Početkom 2000-tih laboratorij nabavlja protočni citometar i to je sljedeći značajni kvalitativni skok u našim istraživanjima. Godine 2003. u laboratorij dolazi Danijela Šantić koja pokreće istraživanja različitih skupina autotrofnog pikoplanktona (Šantić et al., 2011., 2013., 2014.), kao i različitih skupina heterotrofnih bakterija (Šantić et al., 2012.).

U tom razdoblju istraživanja kreću u smjeru određivanja strukturnih i funkcionalnih značajki mikrobnih zajednica i njihovog odgovora na različite ekološke uvjete i antropogene pritiske (Bojanić et al., 2001., 2005., 2006., 2012.; Šolić et al., 2010., 2015.; Redžić et al., 2015.), kao i istraživanja mikrobne hranidbene mreže u nekim ekstremnim staništima (Krstulović i Šolić, 2001.; Šestanović et al., 2005.; Krstulović et al., 2015.). U najnovije vrijeme istraživanja uključuju viruse (brojnost, proizvodnja, stopa lizije bakterijskih stanica) (Ordulj et al., 2015.), a trenutno se provode istraživanja novih specifičnih skupina bakterija, raznolikosti bakterijskih zajednica primjenom molekularnih metoda, te odgovora mikrobne hranidbene mreže na globalno zatopljenje.

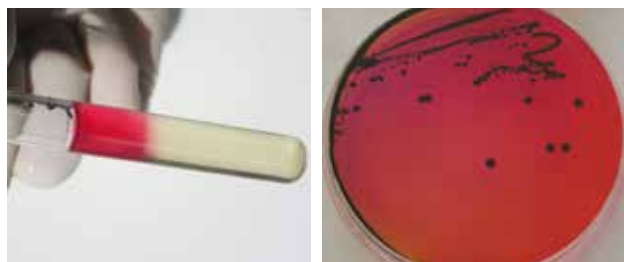


Slika 11: Protočni citometar koji je omogućio veliki napredak u istraživanju strukture mikrobnih zajednica u Jadranu.

Znanstvena istraživanja laboratorija u području morske mikrobne ekologije tijekom zadnjih 20-ak godina sumirana su u knjizi *Microbial Community Ecology of the Adriatic Sea* (Šolić et al., 2016.).

2.5. Sanitarna mikrobiologija

Krajem 1970-ih svijest o negativnom utjecaju ljudskih aktivnosti na morski okoliš značajno jača i kao jedan od važnih parametara toga utjecaja javlja se sanitarna ili mikrobiološka kakvoća mora i morskih organizama koja se počela pratiti preko pokazatelja (indikatora) fekalnog zagađenja. Laboratorij za mikrobiologiju brzo reagira na ove potrebe i pored morske mikrobiologije uvodi sanitarnu mikrobiologiju kao važan dio svojih aktivnosti koji traje i do danas. Slavko Šobot i Nada Krstulović prvi uvode metodu membranske filtracije u analizi indikatora fekalnog zagađenja. Hrvatske vode uspostavljaju 1976. godine monitoring program pod nazivom *Kontrola kvalitete priobalnog mora – «Vir-Konavle»* kojega je provodio Institut za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, koji je po svom obimu i broju parametara bio daleko ispred svog vremena, a koji se uz određene promjene i prilagodbe novim potrebama i vremenima praktički zadržao i do danas. Taj je program, između ostaloga, uključivao kontrolu sanitarne kakvoće mora na velikom broju plaža od Zadra do Dubrovnika, što je bio zadatak našeg laboratorija. Tijekom 1980-ih i 1990-tih Institut je izradio veliki broj Studija o utjecaju na okoliš, gdje je sanitarna mikrobiologija bila obvezatan parametar. Kasnije se uspostavila i kontrola uzgajališta školjkaša gdje su se vršila redovita ispitivanja sanitarne kakvoće školjkaša i mora u kojem se uzgajaju.



Slika 12: Detalji analiza u području sanitarne mikrobiologije.

Tijekom 1980-ih i 1990-ih Program za okoliš Ujedinjenih naroda (UNEP) i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) ulažu velike napore u osposobljavanju država na Mediteranu u pokretanju kontrole mikrobiološke kakvoće mora, posebice u blizini velikih gradova gdje se problem mikrobiološkog zagađivanja sve više otvara. Puno se radi na metodološkim pitanjima (pronalaženje pouzdanih selektivnih medija i procedura za analizu indikatora), kao i na organizaciji radionica na kojima bi se ta znanja prenosila. WHO/UNEP prepoznaje naš laboratorij kao pouzdanog partnera, te nas tijekom druge polovice 1980-ih u više navrata angažira za provođenje ciljanih istraživanja u obliku jednogodišnjih projekata (MED POL Phase II Research) kojima su se trebali riješiti neki metodološki problemi (npr. Krstulović i Šolić, 1988.). Za naš rad na projektima smo umjesto novca izravno dobivali opremu i potrošni materijal. Naime, to je bilo vrijeme velikih nestašica u Hrvatskoj i nemogućnosti naručivanja bilo kakve opreme i potrošnog materijala iz inozemstva, tako da smo uz pomoć ovih projekata i u tim teškim vremenima uspješno opremali laboratorij.

Zahvaljujući uspješnoj suradnji i stečenom povjerenju, WHO/UNEP nam 1988. godine povjerava organizaciju međunarodne radionice *"Fourth intercalibration exercise and consultation meeting on microbiological methods for coastal water quality monitoring"*, Split, Hrvatska, koja se odvijala u našem laboratoriju, te sponzorira još jednu radionicu za hrvatske laboratorije koja je održana 1995. Pozicija laboratorija kao mjesta gdje će se testirati nove metode i obučavati laboratorije zadržala se i do danas. Zadnja takva radionica održana je u našem laboratoriju 2006. godine u suradnji s tadašnjim Ministarstvom zaštite okoliša, prostornog planiranja i graditeljstva RH.

S vremenom su ove analize postale rutinske, te se laboratorij više orijentirao prema znanstvenim temama unutar ove problematike. Problemi koji su najviše istraživani uključivali su preživljavanje indikatora fekalnog zagađenja u morskom okolišu (Tudor et al., 1990.; Krstulović i Šolić, 1991.; Šolić i Krstulović, 1992., 1994.; Jozić et al., 2014.), te koncentriranje indikatora fekalnog zagađenja u školjkašima (Šolić et al., 1999., 2010.; Jozić et al., 2012.).



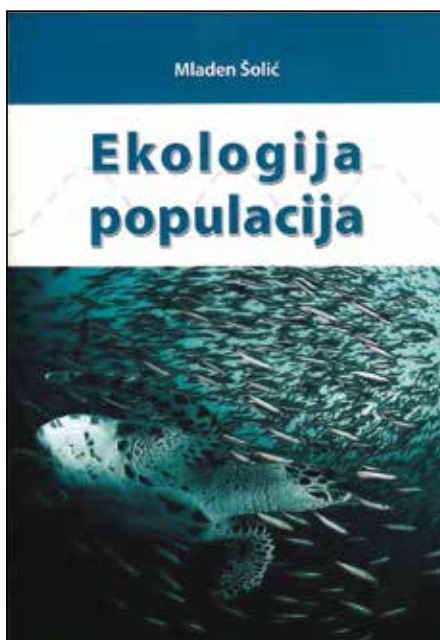
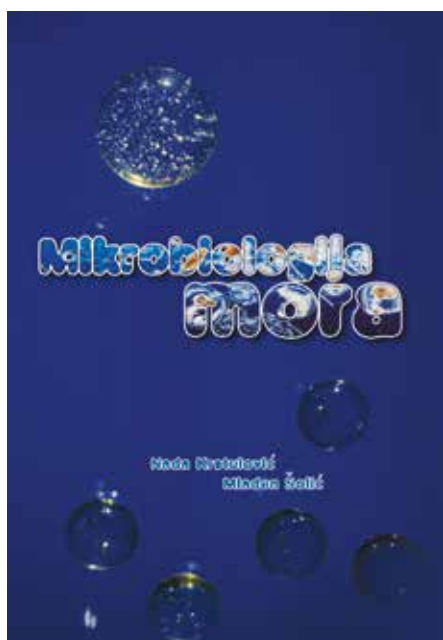
Slika 13: Internacionalne i nacionalne radionice iz problematike mikrobiološke kakvoće mora i morskih organizama koje je organizirao Laboratorij za mikrobiologiju.

2.6. Nastavna aktivnost

Obrazovanje i prenošenje znanja oduvijek su bili uključeni u aktivnosti Laboratorija za mikrobiologiju (predavanja i laboratorijske pokazne vježbe za skupine različitih profila koje su dolazile u posjet Institutu; srednjoškolske i studentske prakse, kraći ili duži boravci studenata s različitih sveučilišta iz Hrvatske i inozemstva i slično). Ipak, ova se aktivnost osobito intenzivirala organiziranjem preddiplomskih i diplomskih studijskih programa *Morsko ribarstvo* i *Biologija i ekologija mora*, te doktorskog studija *Primijenjene znanosti o moru*, čiji je nositelj Sveučilište u Splitu, a koje je osmislio Institut za oceanografiju i ribarstvo, u čemu su osobito aktivnu ulogu imali znanstvenici ovog laboratorija, Nada Krstulović i Mladen Šolić, koji su dugo godina bili i voditelji nekih od ovih studija. Pored toga, ovi su znanstvenici uključeni i u nastavu na doktorskome studiju *Oceanologije* čiji je nositelj Sveučilište u Zagrebu. Tijekom godina rada na ovim studijima osmišljeni su različiti kolegiji koji tretiraju problematiku morske mikrobiologije (Mikrobiologija mora, Virusi u moru, Mikrobiologija zagađenih voda), a rezultati tih aktivnosti bili su i publicirani udžbenici *Mikrobiologija mora* (Krstulović i Šolić, 2006.), *Ekologija populacija* (Šolić, 2014.), *Kvantitativne metode u ekologiji zajednica* (2015.). ■



Slika 15: a) Dodjela godišnje nagrade HAZU-a Nadi Krstulović i Mladenu Šoliću; b) današnji sastav Laboratorija za mikrobiologiju; s lijeva na desno: Mate Pavlović, Stefanija Šestanović, Mladen Šolić, Danijela Šantić, Ana Vrdoljak (doktorantica), Slaven Jozić, Marin Ordulj (post-doktorant sa Sveučilišta u Splitu).



Slika 14: Udžbenici proizašli kao rezultat nastavnih aktivnosti znanstvenika laboratorija.

Tablica 2: Pregled zaposlenika u Laboratoriju za mikrobiologiju tijekom njegove 70-godišnje povijesti.

Ime i prezime	Pozicija	Razdoblje provedeno u laboratoriju	Voditelj(ce) laboratorija
dr. sc. Vlaho Cviić	znanstvenik	1947.-1963.	1947.-1963.
Ojdana Gašpić-Marović	laborantica	1947.-1977.	
dr. sc. Olivera Vlajnić	znanstvenica	1951.-1953.	
Zdravko Pavičić, dipl. biol.	pripravnik	1955.	
Mladen Alajbeg	laborant	1958.-1993.	
Zvonko Radović, dipl. biol.	stručni suradnik	1963.-1967.	1963.-1967.
dr. sc. Slavko Šobot	znanstvenik	1968.-1982.	1968.-1982.
Antonija Međimurec, dipl. biol.	pripravnica	1970.-1972.	
dr. sc. Nada Krstulović	znanstvenica	1974.-2015.	1983.-2015.
dr. sc. Mladen Šolić	znanstvenik	1983.-danas	2016.-danas
Antonio Jurakić, dipl. biol.	pripravnik	1989.-1991.	
dr. sc. Slaven Jozić	stručni savjetnik	1998.-danas	
Mate Pavlović	laborant	1994.-danas	
dr. sc. Stefanija Šestanović	znanstvenica	1995.-danas	
dr. sc. Danijela Šantić	znanstvenica	2003.-danas	
Ana Vrdoljak, mag. biol.	stručna suradnica	2016.-danas	

LITERATURA

- Baranović, A.; Šolić, M.; Vučetić, T.; Krstulović, M. (1993.): Temporal fluctuations of zooplankton and bacteria in the middle Adriatic Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 92, 65-75.
- Bojanić, N.; Šolić, M.; Krstulović, N.; Marasović, I.; Ninčević, Ž.; Vidak, O. (2001.): Seasonal and vertical distribution of the ciliated protozoa and micrometazoa in Kaštela Bay (central Adriatic). *Helgoland Marine Research*, 55, 150-159.
- Bojanić, N.; Šolić, M.; Krstulović, N.; Šestanović, S.; Marasović, I.; Ninčević, Ž. (2005.): Temporal variability in abundance and biomass of ciliates and copepods in the eutrophicated part of Kaštela Bay (Middle Adriatic Sea). *Helgoland Marine Research*, 59, 107-120.
- Bojanić, N.; Šolić, M.; Krstulović, N.; Šestanović, S.; Ninčević, Ž.; Marasović, I.; Brautović, I. (2006.): The role of ciliates within the microbial food web in the eutrophicated part of Kaštela Bay (middle Adriatic Sea). *Scienza Marina*, 70, 431-442.
- Bojanić, N.; Vidjak, O.; Šolić, M.; Krstulović, N.; Brautović, I.; Matijević, S.; Kušpilić, G.; Šestanović, S.; Ninčević, Ž.; Marasović, I. (2012.): Community structure and seasonal dynamics of tintinnid ciliates in Kaštela Bay (middle Adriatic Sea). *Journal of plankton research*, 34, 510-530.
- Cviić, V. (1953.): The Bactericidal and bacteriostatical action of antibiotics on marine bacteria. *Acta Adriatica*, 5(7), 1-30.
- Cviić, V. (1953.): Attachement of bacteria to slides submerged in sea water. *Bilješke - Notes*, Institute of Oceanography and Fisheries, Split, 6, 1-7.
- Cviić, V. (1955.): Red water in the lake „Malo jezero“ (Island of Mljet). *Acta Adriatica* Vol. VI., No. 2., p. 1-15.
- Cviić, V. (1956.): Activity of bacteria in the liberation of phosphate from the sea sediments in bottom water. *Acta Adriatica*, 8(4), 1-31.
- Cviić, V. (1956.): Multiplication of heterotrophic sea bacteria in various H-ion concentrations. *Acta Adriatica*, 8(5), 1-15.
- Cviić, V. (1960.): Contribution a la connaissance du role des bactéries dans l'alimentation des larves de langouste (*Palinurus vulgaris* Latr.). *Rapports et Procès-Verbaux des Reunions*, Monaco-Paris, Vol. 15 (Nouvelle série), 45-47.
- Cviić, V. (1963.): Rasprostranjenost bakterija i bakterijske biomase u južnom Jadranu. *Acta Adriatica*, 10(7), 1-15.
- Cviić, V. (1963.): Premières mensurations de la production organique fondamentale en Adriatique. *Bilješke - Notes*, Institute of Oceanography and Fisheries, Split, 19, 1-4.
- Cviić, V. (1963.): *Bakterije u moru*. Matica hrvatska, Biblioteka za prirodne nauke, Split, 126 str.
- Cviić, V. (1964.): Primary organic production, distribution, and reproduction of bacteria in the middle Adriatic euphotic zone. *Acta Adriatica*, 10(9), 1-24.
- Cviić, V. (1964.): Prilog poznavanju rasprostranjenosti bakterijske biomase u srednjem Jadranu. *Acta Adriatica*, 11(6), 59-64.
- Fuks, D.; Devescovi, M.; Precali, R.; Krstulović, N.; Šolić, M. (1991.): Bacterial abundance and activity in the highly stratified estuary of the Krka River. *Marine Chemistry*, 32, 333-346.
- Jozić, S.; Šolić, M.; Krstulović, N. (2012.): The accumulation of the indicator bacteria *Escherichia coli* in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*) under experimental conditions. *Acta Adriatica*, 53, 353-361.
- Jozić, S.; Morović, M.; Šolić, M.; Krstulović, N.; Ordulj, M. (2014.): Effect of solar radiation, temperature and salinity on the survival of two different strains of *Escherichia coli*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23, 1852-1859.

- Krstulović, N.; Šolić, M. (1988.): Comparison of faecal coliform levels in mussel flesh and flesh together with intervalvular fluid. *Acta Adriatica*, 29, 67–73.
- Krstulović, N.; Šolić, M. (1988.): Distribution of proteolytic, amylolytic and lipolytic bacteria in the Kaštela Bay. *Acta Adriatica*, 29, 75–82.
- Krstulović, N.; Šolić, M. (1990.): Long-term study of heterotrophic bacteria as indicators of eutrophication of the open middle Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 30, 611–617.
- Krstulović, N.; Šolić, M.; Marasović, I.; Odžak, N. (1991.): Bacteria and their distribution under red-tide conditions. *Kieler Meeresforschungen*, 8, 284–289.
- Krstulović, N.; Šolić, M. (1991.): Spatial distribution of faecal pollution indicators in the Kaštela Bay under different meteorological conditions. *Acta Adriatica*, 32, 827–835.
- Krstulović, N.; Pucher-Petković, T.; Šolić, M. (1995.): The relation between bacterioplankton and phytoplankton production in the middle Adriatic Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 9, 41–45.
- Krstulović, N.; Šolić, M.; Marasović, I. (1997.): Relationship between bacteria, phytoplankton and heterotrophic nanoflagellates along the trophic gradient. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 51, 433–44.
- Krstulović, N.; Šolić, M. (2001.): Distribution of phototrophic sulfur bacteria throughout the time scale of the anoxic water renewal in the Rogoznica Lake. *Fresenius Environmental Bulletin*, 10, 586–589.
- Krstulović, N.; Šolić, M. (2006.): *Mikrobiologija mora*. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split. 317 str.
- Krstulović, N.; Šolić, M.; Šantić, D.; Maršić-Lučić, J.; Ordulj, M.; Šestanović, S. (2013.): Microbial community structure in two anchialine caves on Mljet Island (Adriatic Sea). *Acta Adriatica*, 54, 183–198.
- Marasović, I.; Gačić, M.; Kovačević, V.; Krstulović, N.; Kušpilić, G.; Pucher-Petković, T.; Odžak, N.; Šolić, M. (1991.): Development of the red tide in the Kaštela Bay (Adriatic Sea). *Marine Chemistry*, 32, 375–387.
- Ordulj, M.; Krstulović, N.; Šantić, D.; Jozić, S.; Šolić, M. (2015.): Distribution of marine viruses in the Central and South Adriatic Sea. *Mediterranean Marine Science*, 16, 65–72.
- Redžić, A.; Krstulović, N.; Šolić, M.; Šantić, D.; Ordulj, M. (2015.): Dynamics of prokaryotic community in Boka Kotorska Bay (South-eastern Adriatic Sea). *Acta Adriatica*, 56, 157–170.
- Šantić, D.; Krstulović, N.; Šolić, M.; Kušpilić, G. (2011.): Distribution of *Synechococcus* and *Prochlorococcus* in the central Adriatic Sea. *Acta Adriatica*, 52, 101–113.
- Šantić, D.; Krstulović, N.; Šolić, M.; Kušpilić, G. (2012.): HNA and LNA bacteria in relation to the activity of heterotrophic bacteria. *Acta Adriatica*, 53, 25–40.
- Šantić, D.; Krstulović, N.; Šolić, M.; Ordulj, M.; Kušpilić, G. (2013.): Dynamics of prokaryotic picoplankton community in the central and southern Adriatic Sea (Croatia). *Helgolander Marine Research*, 67, 471–481.
- Šantić, D.; Šestanović, S.; Šolić, M.; Krstulović, N.; Kušpilić, G.; Ordulj, M.; Ninčević Gladan, Ž. (2014.): Dynamics of picoplankton community from coastal waters to the open sea in the Central Adriatic. *Mediterranean Marine Science*, 15, 179–188.
- Šestanović, S.; Šolić, M.; Krstulović, N.; Ninčević, Ž. (2004.): Seasonal and vertical distribution of planktonic bacteria and heterotrophic nanoflagellates in the middle Adriatic Sea. *Helgolander Marine Research*, 58, 83–92.
- Šestanović, S.; Šolić, M.; Krstulović, N.; Šegvić, D.; Ciglencečki, I. (2005.): Vertical structure of microbial community in an eutrophic meromictic saline lake. *Fresenius Environmental Bulletin*, 14, 668–675.
- Šestanović, S.; Šolić, M.; Krstulović, N.; Bogner, D. (2005.): Volume, abundance and biomass of sediment bacteria in the eastern mid Adriatic Sea. *Acta Adriatica*, 46, 177–191.
- Šestanović, S.; Šolić, M.; Krstulović, N. (2009.): The influence of organic matter and phytoplankton pigments on the distribution of bacteria in sediments of Kaštela Bay (Adriatic Sea). *Sciencia Marina*, 73, 83–94.
- Šolić, M. (1988.): Effects of phytoplankton on the growth of bacteria under experimental conditions. *Acta Adriatica*, 29, 83–104.
- Šolić, M.; Krstulović, N. (1991.): Distribution of heterotrophic bacteria as affected by eutrophication and fluctuations of environmental factors. *Kieler Meeresforschungen*, 8, 59–65.
- Šolić, M.; Krstulović, N. (1991.): Time series of heterotrophic bacteria density in the central Adriatic Sea. *Continental Shelf Research*, 11, 397–407.
- Šolić, M.; Krstulović, N. (1992.): Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity, and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 24, 411–416.
- Šolić, M.; Krstulović, N. (1992.): Stimulative effect of *Phaeodactylum tricornutum* on the growth of *Flavobacterium* sp. *Acta Adriatica*, 33, 67–74.
- Šolić, M.; Krstulović, N. (1994.): The role of predation in controlling bacterial and heterotrophic nanoflagellate standing stocks in the coastal Adriatic Sea: seasonal patterns. *Marine Ecology Progress Series*, 114, 219–235.
- Šolić, M.; Krstulović, N. (1994.): Presence and survival of *Staphylococcus aureus* in the coastal area of Split (Adriatic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 28, 696–700.
- Šolić, M.; Krstulović, N. (1995.): Bacterial carbon flux through microbial loop in Kaštela Bay (Adriatic Sea). *Ophelia*, 41, 345–360.
- Šolić, M.; Krstulović, N.; Marasović, I.; Baranović, A.; Pucher-Petković, T.; Vučetić, T. (1997.): Analysis of time series of planktonic communities in the Adriatic Sea: distinguishing between natural and man-induced changes. *Oceanologica Acta*, 20, 131–143.
- Šolić, M.; Krstulović, N.; Bojanić, N.; Marasović, I.; Ninčević, Ž. (1998.): Seasonal switching between relative importance of bottom-up and top-down control of bacterial and heterotrophic nanoflagellate abundance. *Journal of Marine Biology Association U.K.*, 78, 755–766.

- Šolić, M.; Krstulović, N.; Jozić, S.; Curać, D (1999.): The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. *Environment International*, 25, 991-1000.
- Šolić, M. (2000.) Time series of biological data in the Adriatic Sea. In: CIESM Workshop Series No 10. "The Eastern Mediterranean climatic transient: its origin, evolution and impact on the ecosystem" (Briand, F. ed.), 37-39.
- Šolić, M.; Krstulović, N. (2000.) *Ekologija morskog bakterioplanktona*. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split. 452 str.
- Šolić, M.; Krstulović, N.; Šestanović, S. (2001.): The roles of predation, substrate supply and temperature in controlling bacterial abundance: interaction between spatial and seasonal scale. *Acta Adriatica*, 42, 35-48.
- Šolić, M.; Krstulović, N.; Vilibić, I.; Kušpilić, G.; Šestanović, S.; Šantić, D.; Ordulj, M. (2008.): The role of water mass dynamics in controlling bacterial abundance and production in the middle Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 65, 388-404.
- Šolić, M.; Krstulović, N.; Vilibić, I.; Bojanić, N.; Kušpilić, G.; Šestanović, S.; Šantić, D.; Ordulj, M. (2009.): Variability in the bottom-up and top-down control of bacteria on trophic and temporal scale in the middle Adriatic Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 58, 15-29.
- Šolić, M.; Jozić, S.; Krstulović, N. (2010.): Interactive effects of temperature and salinity on the rate of concentration of *Escherichia coli* in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*). *Fresenius Environmental Bulletin*, 19, 1634-1639.
- Šolić, M.; Krstulović, N.; Kušpilić, G.; Ninčević Gladan, Ž.; Bojanić, N.; Šestanović, S.; Šantić, D.; Ordulj, M. (2010.): Changes in microbial food web structure in response to changed environmental trophic status: A case study of the Vranjic Basin (Adriatic Sea). *Marine Environmental Research*, 70, 239-249.
- Šolić, M. (2014.): *Ekologija populacija*. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split. 343 str.
- Šolić, M. (2015): *Kvantitativne metode u ekologiji zajednica*. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split. 134 str.
- Šolić, M.; Krstulović, N.; Šantić, D.; Šestanović, S.; Ordulj, M.; Bojanić, N.; Kušpilić, G. (2015.): Structure of microbial communities in phosphorus-limited estuaries along the eastern Adriatic coast. *Journal of Marine Biology Association U.K.*, 95, 1565-1578.
- Šolić, M.; Krstulović, N.; Šestanović, S.; Šantić, D.; Bojanić, N.; Ordulj, M.; Jozić, S. (2016.): *Microbial Community Ecology of the Adriatic Sea*. LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany, 436 p.
- Tudor, M.; Šolić, M.; Krstulović, N. (1990.): T90 of total coliforms, faecal coliforms and faecal streptococci in the Kaštela Bay. *Acta Adriatica*, 31, 67-74.
- ZoBell, C. E. (1946.): *Marine Microbiology*. Waltham, Chronica Botanica Company, 240.